

**STUDI SINERGITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI EKSTRAK
ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L) TERSTANDAR DAN
AMOXICILLIN TERHADAP *Escherichia coli*-Extended Spectrum
 β -Lactamase (ESBL) dan *Methicillin Resistant Staphylococcus
aureus* (MRSA)**

ANTIBACTERIAL SYNERGY STUDY OF THE COMBINATION OF
STANDARDIZE COCOA SEED (*Theobroma cacao* L) ETHANOL
EXTRACT AND AMOXICILLIN AGAINST *Escherichia coli*-Extended
Spectrum β -Lactamase and *Methicillin Resistant Staphylococcus
aureus* (MRSA)

DEDY MA'RUF

N012191021



SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023

**STUDI SINERGITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI EKSTRAK
ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L) TERSTANDAR DAN
AMOXICILLIN TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli*-*Extended*
Spectrum β -Lactamase (ESBL) dan *Methicillin Resistant*
Staphylococcus aureus (MRSA)**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program studi

Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

DEDY MA'RUF

**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

LEMBAR PENGESAHAN

STUDI SINERGITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI EKSTRAK ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L) TERSTANDAR DAN AMOXICILLIN TERHADAP *Escherichia coli*-Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

Disusun dan diajukan oleh

DEDY MA'RUF

NIM N012191021

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Magister Herbal Medicine Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

Pada tanggal 11 Agustus 2023

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

Pembimbing Utama

Prof. Subehan S.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt
NIP.197509252001121002

Pembimbing Pendamping

Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt
NIP. 196111111987032001

Ketua Program Studi Magister Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi

Muhammad Aswad, M.Si.Ph.D., Apt
NIP.198001012003121004

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



Prof. Dr. rer. nat. Marianti A. Manggau, Apt
NIP. 196703191992032002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Dedy Ma'ruf
NIM : N012191021
Program studi : Farmasi
Jenjang : S2

Menyatakan denggan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

STUDI SINERGITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI EKSTRAK ETANOL BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L) TERSTANDAR DAN AMOXICILLIN TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli-Extended Spectrum β -Lactamase* (ESBL) dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

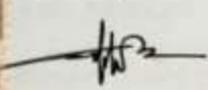
Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau pemikiran orang lain bahwa tesis yang saya tulis ini benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa Sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut

Makassar, 27 Agustus 2023

Yang menyatakan,




Dedy ma'ruf

PRAKATA

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-nya berupa kesehatan, kekuatan, ilmu yang sempurna, dan waktu yang begitu berharga sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini sebagai persyaratan untuk menyelesaikan studi dan memperoleh gelar magister pada Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Dalam penyusunan tesis ini, penulis begitu menyadari banyak kendala yang dialami. Namun dengan adanya dorongan, bantuan serta dukungan dari berbagai pihak baik yang bersifat moral maupun material, pada akhirnya penulis mampu menyelesaikan tesis ini.

Untuk itu, perkenankan penulis menyampaikan rasa syukur, ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

1. Prof. Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D.,Apt. dan Prof. Dr. Sartini, M.Si. selaku Komisi Penasihat yang telah banyak memberi bimbingan, nasehat, masukan dan arahan dan kepada penulis dalam penyusunan tesis ini.
2. Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt, Dr. Herlina Rante, M.Si., Apt, Prof. Firzan Nainu, M.Biomed, Ph.D., Apt selaku tim Komisi Penguji yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang sangat membantu dalam penyusunan tesis ini.

3. Dekan, Wakil Dekan, Ketua Prodi S-2, Bapak-Ibu dosen, serta seluruh staf karyawan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah mendidik, memberikan sarana dan memotivasi penulis dari awal memasuki bangku kuliah hingga saat ini.
4. Kedua orang tua penulis, Ayahanda Alm. Drs. H. Abd. Kadir R dan Ibunda Hj. Suryati M atas doa, dukungan materil, non materil dan kesabaran serta kasih sayang tulus yang telah diberikan kepada penulis. Istri, Anak, saudara dan seluruh besar yang telah memotivasi dan turut mendoakan.
5. Seluruh laboran pada laboratorium Fakultas Farmasi UNHAS atas segala bantuan dan dukungan dalam pelaksanaan penelitian tesis ini.
6. Rekan-rekan magister pascasarjana Angkatan 2019 yang telah banyak membantu, semoga kemudahan dan kesuksesan meyertai kita semua.
7. Semua pihak-pihak yang terlibat, yang tidak sempat disebut namanya.

Semoga karya ini dapat memberi manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang farmasi, *amin yaa rabbal alaamin.*

Makassar, Agustus 2023

Dedy Ma'ruf

ABSTRAK

Dedy Ma'ruf. Studi sinergitas antibakteri kombinasi ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao* L) terstandar dan amoxicillin terhadap *Escherichia coli-Extended Spectrum β -Lactamase* (ESBL) dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (dibimbing oleh Subehan dan Sartini)

Escherichia coli-Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan bakteri yang sudah resisten terhadap beberapa antibiotika, termasuk amoxicillin. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa senyawa bioaktif tanaman termasuk golongan polifenol memiliki sinergitas dengan antibiotika. Biji kakao (*Theobroma Cacao* L.) mengandung senyawa polifenol yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri dan antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan metode ekstraksi yang menghasilkan kadar polifenol total yang tinggi, menstandarisasi ekstrak yang diperoleh dan mengevaluasi kemampuan sinergitas ekstrak etanol biji kakao untuk meningkatkan aktivitas antibiotika amoxicillin. Biji kakao MCC 02 diperoleh dari 3 kabupaten di Sulawesi Selatan. Selanjutnya diekstraksi menggunakan 3 metode, yaitu Maserasi (M), ekstraksi dengan bantuan Microwave (MAE), dan ekstraksi dengan bantuan Ultrasonikator (UAE). Ekstrak terpilih dilakukan standarisasi spesifik dan non spesifik. Selanjutnya dilakukan uji sinergitas menggunakan metode *checkerboard microdilution* assay terhadap bakteri ESBL dan MRSA. Hasil penelitian menunjukkan kadar polifenol total dengan menggunakan ketiga metode ekstraksi M, MAE, UAE diperoleh rendemen, masing-masing $15,29 \pm 0,66\%$, $13,13 \pm 0,28\%$ dan $12,77 \pm 1,12\%$ dan kandungan rata-rata polifenol total, yaitu $(28,89 \pm 4,53)\%$, $(31,90 \pm 3,34)\%$, $(36,07 \pm 4,41)\%$ dihitung ekuivalen asam gallat. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak biji kakao diperoleh nilai kadar hambat minimal (KHM) terhadap bakteri ESBL dan MRSA masing-masing sebesar 5 mg/mL. KHM amoxicillin terhadap ESBL > 0,256 mg/mL dan MRSA 0,016 mg/mL. Nilai KHM amoxicillin yang dikombinasi dengan ekstrak biji kakao terhadap ESBL 0,064 mg/mL dan terhadap MRSA 0,008 mg/mL. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas antibakteri kombinasi amoxicillin dengan ekstrak biji kakao terhadap ESBL dan MRSA belum mampu meningkatkan aktivitas antibakteri amoxicillin dari resisten menjadi sensitif.

Kata Kunci : *Theobroma cacao* L., MCC 02, polifenol, standarisasi, sinergitas, amoxicillin, ESBL, MRSA

ABSTRACT

Dedy Ma'ruf. "Synergy antibacterial study of the combination of standardized cocoa seed (*theobroma cacao* L) ethanol extract and amoxicillin against *Escherichia coli-Extended Spectrum β -Lactamase* and *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteria" (supervised by Subehan and Sartini).

Escherichia coli-Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) and *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) are bacteria that have been resistant to several antibiotics, including amoxicillin. Several studies have shown that plant bioactives including polyphenols have synergy with antibiotics. Cocoa beans (*Theobroma Cacao* L.) contain polyphenolic compounds that are known to have antibacterial and antioxidant activities. The objectives of this study were: Determine the extraction method that produces high levels of total polyphenols, standardize the extract obtained and evaluate the ability of the synergy of ethanol extract of cocoa beans to increase the activity of amoxicillin antibiotics. MCC 02 cocoa beans were obtained from 3 districts in South Sulawesi. Furthermore, they were extracted using 3 methods, namely: Maceration (M), Microwave-assisted extraction (MAE), and Ultrasound-assisted extraction (UAE). The selected extracts were subjected to specific and non-specific standardization. Furthermore, synergy test was conducted using checkerboard microdilution assay method against ESBL and MRSA bacteria. The results showed the total polyphenol content using the three extraction methods M, MAE, UAE obtained yields, respectively: $15.29 \pm 0.66\%$, $13.13 \pm 0.28\%$ and $12.77 \pm 1.12\%$ and the average content of total polyphenols, namely: $(28.89 \pm 4.53)\%$, $(31.90 \pm 3.34)\%$, $(36.07 \pm 4.41)\%$ calculated as gallic acid equivalents. The results of the antibacterial activity test of cocoa bean extract obtained a minimum inhibitory level (KHM) value against ESBL and MRSA bacteria each at 5 mg/mL. KHM of amoxicillin against ESBL > 0.256 mg/mL and MRSA 0.016 mg/mL. The KHM value of amoxicillin combined with cocoa extract against ESBL was 0.064 mg/mL and against MRSA 0.008 mg/mL. The results showed that the antibacterial activity of the combination of amoxicillin with cocoa seed extract against ESBL and MRSA has not been able to increase the antibacterial activity of amoxicillin from resistant to sensitive.

Keyword : *Theobroma Cacao* L, MCC 02, Polyphenols, Standardization, Synergy, Amoxicillin, ESBL, MRSA

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	Error! Bookmark not defined.
PRAKATA.....	iii
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT	viii
BAB I	1
PENDAHULUAN.....	1
A. LATAR BELAKANG	1
B. RUMUSAN MASALAH	4
C. TUJUAN PENELITIAN	4
D. MANFAAT PENELITIAN	5
BAB II	6
TINJAUAN PUSTAKA	6
A. URAIAN UMUM TANAMAN KAKAO	6
B. EKSTRAKSI	9
C. URAIAN BAKTERI UJI DAN ANTIBIOTIK.....	11
D. SINERGITAS.....	17
E. STANDARDISASI	18
F. KERANGKA TEORI	23
G. KERANGKA KONSEP	23
BAB III	25
METODE PENELITIAN.....	25
A. RANCANGAN PENELITIAN	25
B. WAKTU DAN LOKASI PENELITIAN	25
C. ALAT DAN BAHAN	25
D. PROSEDUR PENELITIAN.....	26

BAB IV.....	38
HASIL DAN PEMBAHASAN	38
A. Penetapan Rendemen dan Kadar Polifenol Total.....	38
B. Pengujian Standardisasi Ekstrak Kakao.....	43
C. Sinergitas.....	47
BAB V.....	54
PENUTUP	54
V.1. Kesimpulan	54
V.2. Saran	54
DAFTAR PUSTAKA.....	55

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Resistensi antimikroba pada bakteri patogen merupakan tantangan yang terkait dengan morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Pola resistensi multi obat pada gram positif dan negatif sulit diobati dan bahkan tidak dapat diobati dengan antibiotik konvensional (Frieri, Kumar, and Boutin 2017). Intensitas penggunaan antibiotik yang relatif tinggi menimbulkan berbagai permasalahan dan merupakan ancaman global bagi Kesehatan terutama resistensi bakteri terhadap antibiotik. Beberapa bakteri yang resisten terhadap antibiotik sudah banyak ditemukan di seluruh dunia, yaitu Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin Resistant Enterococci (VRE), Penicillin-Resistant Pneumococci, Enterobacter Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL), Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* dan Multiresistant *Mycobacterium tuberculosis* (Kementerian Kesehatan RI 2013).

Resistensi antibiotika terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang terus berkembang, termasuk golongan β -laktam amoxicillin. Sementara ini Amoxicillin masih banyak ditemukan di pasaran antibiotik ini biasanya menjadi obat pilihan pada kelasnya karena bioavailabilitasnya yang tinggi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pasien yang terinfeksi bakteri *S.aureus* dan *E.coli* resisten terhadap antibiotik amoxicillin (Handayany et al. 2020) karena masing-masing

menghasilkan enzim penicillinase dan *E.coli* yang memproduksi β -lactamase (Sumampouw, 2018).

Pendekatan ilmiah yang banyak dilakukan untuk mengatasi resistensi tersebut adalah penggunaan senyawa bioaktif tanaman yang berpotensi sebagai anti mikroba dan modulator untuk menghasilkan efek sinergitas dengan antibiotik. Adapun beberapa tanaman yang biasa digunakan sebagai antibakteri yang mengandung senyawa polifenol seperti bunga *Cathamus tinctorius*, ekstrak bawang hitam, teh hijau, biji kakao, dll. Polifenol tanaman adalah senyawa beragam secara struktural yang telah digunakan selama berabad-abad untuk tujuan pengobatan, termasuk pengobatan infeksi dan memiliki tidak hanya pada aktivitas antimikroba, tetapi juga antioksidan, anti inflamasi dan aktivitas antikanker (Álvarez-Martínez et al. 2018).

Salah satu tanaman yang kaya akan senyawa polifenol adalah biji kakao (*Theobroma cacao L.*). Biji kakao mengandung senyawa polifenol yang tinggi sekitar 12-18%, dan juga mengandung lemak kakao 40-54% yang penyusunnya antara lain: trigliserida dari asam stearat, asam oleat, asam palmitat (Othman et al., 2007). Salah satu klon yang banyak ditanam di Sulawesi selatan adalah MCC 02 (*Masamba Cacao Clone 02*). Kakao MCC 02 termasuk salah satu klon hibrida dari Forastero, keping biji berwarna ungu (Sari et al. 2022).

Telah dilaporkan bahwa ekstrak etanol *Theobroma cacao L* memberikan aktivitas antibakteri terhadap *E.coli* (Ariza et al. 2014), dan

juga mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus* (Emelda et al. 2016).

Dengan adanya kandungan lemak yang tinggi pada biji kakao memungkinkan akan mengurangi polifenol yang terekstraksi pada biji kakao sehingga diperlukan penggunaan pelarut yang bersifat non polar seperti n-heksana untuk mengekstraksi lemaknya terlebih dahulu atau secara mekanik dengan pengepresan dengan pompa hidrolis, kemudian dilanjutkan dengan penggunaan pelarut yang bersifat polar untuk mengekstraksi senyawa polifenolnya. Metode ekstraksi dapat mempengaruhi senyawa polifenol yang terekstraksi.

Penggunaan suatu tanaman menjadi obat, selain harus memiliki khasiat yaitu dengan adanya bukti ilmiah mengenai aktivitas farmakologi, juga harus memenuhi syarat obat lainnya, yaitu: bermutu dan terjamin keamanannya. Ekstrak tanaman memiliki kelemahan, yaitu sulitnya mengontrol kualitas dan keamanan dari bahan yang digunakan sehingga khasiat, mutu serta profil keamanannya menjadi bervariasi (Azah NMuchtarichie RIskandar et al ., 2020).

Farmakope Herbal Indonesia (2017) mempersyaratkan perlunya dilakukan standardisasi, yang meliputi: standardisasi spesifik dan non spesifik. Standardisasi adalah suatu proses yang dilakukan untuk menentukan standar atau karakter yang berkaitan dengan parameter, kualitatif dan nilai kuantitatif yang memberikan jaminan terhadap kualitas, kemanjuran, keamanan dan reproduktifitas (Azah NMuchtarichie RIskandar Y et al., 2020).

Berdasarkan latar belakang tersebut , maka dilakukan pengujian efek sinergitas antara ekstrak biji kakao terstandar dengan Amoxicillin, yang diujikan terhadap bakteri *Escherichia coli-Extended Spectrum β -Lactamase* (ESBL) dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

B. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan pada latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka dapat dirumuskan masalah adalah sebagai berikut :

1. Bagaimana metode ekstraksi biji kakao yang menghasilkan polifenol total paling optimal?
2. Bagaimana hasil standardisasi spesifik dan non spesifik ekstrak etanol biji kakao?
3. Bagaimana efek sinergitas kombinasi ekstrak etanol biji kakao terhadap bakteri *Escherichia coli-Extended Spectrum β -Lactamase* (ESBL) dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)?

C. TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini berguna untuk :

1. Mendapatkan metode ekstraksi biji kakao yang menghasilkan polifenol total paling optimal.
2. Mendapatkan hasil standardisasi spesifik dan non spesifik ekstrak etanol biji kakao.
3. Mendapatkan efek sinergisme kombinasi ekstrak etanol biji kakao terhadap bakteri *Escherichia coli-Extended Spectrum β -Lactamase* (ESBL) dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

D. MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan pengembangan ilmu pengetahuan dibidang ilmu farmasi tentang sinergitas ekstrak biji kakao terstandar dengan amoxicillin terhadap bakteri *Escherichia coli-Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL)* dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. URAIAN UMUM TANAMAN KAKAO

1. Klasifikasi Kakao

Kakao (*Theobroma cocoa* L.) merupakan tanaman keras yang berasal dari Amerika Selatan. Tanaman ini berbentuk pohon yang ketinggiannya dapat mencapai 10 meter. Taksonomi sistematika tanaman kakao adalah sebagai berikut : (Fahrurrozi et al. 2020)

Divisi : *Spermatophyta*
Subdivisi : *Angiospermae*
Kelas : *Dicotyledonae*
Subkelas : *Dialypetalae*
Ordo : *Malvales*
Famili : *Sterculiaceae*
Genus : *Theobroma*
Species : *Theobroma cacao* Linneaus

Tanaman kakao biasanya ditanam pada kondisi tanah yang memiliki struktur tanah yang gembur dan sistem drainase yang baik. Hal ini karena tanaman kakao memerlukan permukaan air tanah yang dalam dan pH antara 6-7. Intensitas cahaya yang ideal bagi tanaman kakao, yaitu antara 50-70%, dan suhu yang ideal untuk tumbuhnya adalah sekitar 20-30% dengan fluktuasi suhu yang tidak terlalu besar. Selain itu, tanaman kakao juga dapat tumbuh dengan baik pada

kertinggian 0-500 meter di atas permukaan laut (mdpl) dengan curah hujan yang optimal, berkisar antara 1.500-2.500 mm setiap tahun (Fahrurrozi et al. 2020).

2. Morfologi

a. Buah (*fructus*)

Buah kakao berupa buah buni dengan daging bijinya sangat lunak. Bentuk, ukuran, dan warna buah kakao bervariasi dan merupakan salah satu karakter penting sebagai penciri perbedaan antar genotipe kakao. Berdasarkan bentuk buah terbagi menjadi empat golongan, yaitu Angoleta (buah berbentuk oblong), Cundeamor (buah berbentuk ellips), Amelonado, dan Calabacil (buah berbentuk bulat). Permukaan buah halus, agak halus, agak kasar, dan kasar dengan alur dangkal, sedang, dan dalam, jumlah alur sekitar 10 dengan tebal antara 1-2 cm tergantung jenis klonnya. Panjang buah 16,2–20,50 dengan diameter 8–10,07 cm. Buah muda bervariasi warnanya, yaitu merah muda, merah muda keputihan, merah muda kecokelatan, merah kecokelatan, merah kehijauan, merah kusam, merah, merah tua, merah tua mengkilap, hijau muda, hijau muda keputihan, kehijauan, hijau, dan kecokelatan. Buah masak berwarna merah kekuningan, kuning kemerahan, kuning cerah, kuning agak kehijauhijauan, dan orange. Warna buah dapat digunakan untuk identifikasi kelompok genetik kakao. Kakao jenis Criollo atau Trinitario buahnya umumnya berwarna merah

sedangkan jenis Forastero umumnya berwarna hijau termasuk sebagian jenis Trinitario. Buah kakao terdiri dari 3 komponen utama, yaitu kulit buah, plasenta, dan biji. Komponen terbesar dari buah kakao adalah kulit buah (lebih dari 70% berat buah masak). Persentase biji kakao dalam buah antara 27-29%, sisanya plasenta yang merupakan pengikat dari sekitar 30-40 biji yang terdapat dalam buah. Kulit dalam (endocarpium) tebal, berdaging, keras seperti kayu saat dikeringkan dengan ketebalan antara 4-8 mm. Buah muda disebut pentil (*cherelle*) ukurannya kurang dari 10 cm, seringkali mengalami keguguran (*cherelle wilt*) sebagai gejala spesifik dari tanaman kakao.

b. Biji (*semen*)

Biji kakao dapat dibagi menjadi tiga bagian pokok, yaitu kotiledon (87,10%), kulit (12%), dan lembaga (0,9%). Jumlah biji per buah sekitar 20-60 dengan kandungan lemak biji 40- 59%. Biji berbentuk bulat telur agak pipih dengan ukuran 2,5 x 1,5 cm. Biji kakao diselimuti oleh lendir (*pulp*) berwarna putih. Lapisan yang lunak dan manis rasanya, jika telah masak lapisan tersebut dinamakan *pulp* atau *micilage*. *Pulp* dapat menghambat perkecambahan, oleh karena itu harus dibuang untuk menghindari kerusakan biji (Martono 2014)

3. Komponen kimia

Biji kakao kaya akan komponen-komponen senyawa fenolik, antara lain : katekin, epikatekin, proantosianidin, asam fenolat, tannin dan flavonoid lainnya (Othman et al. 2007)

Biji kakao masih mengandung komponen fungsional seperti *theobromine*, kafein, dan polifenol. Senyawa-senyawa tersebut merupakan komponen fitokimia hasil metabolit sekunder tanaman. Komponen fitokimia dapat diisolasi dari tanaman dengan cara ekstraksi. Salah satu metode ekstraksi yang dapat diterapkan adalah maserasi menggunakan pelarut organik seperti etanol dan aseton (Kayaputri et al. 2014).

Telah ditemukan bahwa biji kakao mengandung senyawa polifenol cukup besar meliputi katekin 33- 42 %, leukosianidin 23- 25 %, dan antosianin 5 %. Senyawa polifenol biji kakao terbukti memiliki aktifitas antioksidan dan antibakteri yang bermanfaat bagi tubuh (Kumalasari and Suswati 2015).

B. EKSTRAKSI

Ekstraksi adalah proses penarikan kandungan senyawa kimia yang terdapat pada simplisia. Beberapa metode ekstraksi bergantung pada tekstur dan kandungan air tumbuhan yang diekstraksi dan jenis senyawa yang diisolasi (Harbone et al. 1996)

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut

dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Ekstrak awal sulit dipisahkan melalui teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Oleh karena itu, ekstrak awal perlu dipisahkan ke dalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama (Mukhtarini 2011). Ada beberapa metode ekstraksi, yaitu :

a. Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Cairan penyari yang dapat digunakan dapat berupa air, etanol, air-etanol atau pelarut lain.

b. *Microwave Assisted Extraction (MAE)*

MAE adalah metode ekstraksi dengan bantuan gelombang elektromagnetik berfrekuensi tinggi dengan rentang frekuensi dari 0,3 hingga 200 GHz. Metode MAE berbeda dengan metode ekstraksi konvensional. Pada metode ekstraksi konvensional, panas menembus perlahan dari luar ke dalam suatu bahan, sedangkan dalam metode MAE, pemanasan muncul tepat di inti bahan yang sedang dipanaskan

dan panas menyebar dari dalam ke luar bahan tersebut. Metode MAE memiliki banyak keuntungan dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya, yaitu waktu ekstraksi yang lebih singkat, menghasilkan *yield* yang lebih besar, penggunaan energi yang lebih kecil, dan lebih hemat biaya karena berkurangnya jumlah penggunaan pelarut (Zahar et al. 2021).

c. *Ultrasonic Assist Extraction (UAE)*

Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) adalah metode yang digunakan untuk mengekstraksi senyawa dari bahan alam, seperti tumbuhan, dengan menggunakan gelombang ultrasonik. Prinsip UEA didasarkan pada kemampuan gelombang ultrasonik untuk membuat gelembung kavitasi dalam pelarut, yang kemudian hancur dan menghasilkan gelombang tekanan tinggi yang membantu memecah dinding sel dari bahan yang diekstrak. Metode ini lebih cepat dan membutuhkan lebih sedikit pelarut daripada metode ekstraksi konvensional.

C. URAIAN BAKTERI UJI DAN ANTIBIOTIK

1. *Staphylococcus aureus*

Salah satu bakteri yang termasuk bakteri patogen yang diperoleh dari manusia sendiri dan sangat besar potensi patogennya adalah *staphylococcus aureus* (Jawetz, Melnick, and Adelberg's 2018)

Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*, yaitu:

Kingdom : Bacteria
Phylum : Firmicutes
Class : Bacilli
Ordo : Bacillales
Family : Staphylococcaceae
Genus : Staphylococcus
Spesies : *Staphylococcus aureus*

2. *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

Strain *Staphylococcus aureus* resisten Methicillin telah memperoleh ketahanan terhadap Methicillin dan Antibiotika Beta laktam lainnya (seperti Penisilin dan Sefalosporin) via gen MecA atau MecC. Kebanyakan MRSA membawa gen MecA, yang berada pada genetika elemen mobile besar yang disebut mafia kaset kohort *staphylococci*. *staphylococcus aureus cassette chromosome mec* (SCCmec). Gen ini kode untuk protein pengikat penisilin, PBP2a, yang mengganggu efek antibiotika beta laktam di dinding sel. Hal ini menyebabkan perlawanan terhadap hampir semua antibiotika beta laktam termasuk penisilin semi-sintesis seperti Methicillin, Oxacillin atau beta laktam termasuk penisilin semi-sintesis seperti Methicillin, Oxacillin atau (misalnya, toksik sindrom toksin 1, toksin eksfoliatif A atau B, dan enterotoksin) yang terkait dengan sindrom spesifik seperti sindrom shock toksik. Seperti mec A, mec C juga berada di SCCmec, untuk versi PBP2a yang berbeda untuk mengganggu

efek antibiotika beta laktam di dinding sel (Jawetz, Melnick, and Adelberg's 2018)

3. *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah salah satu jenis bakteri yang secara normal hidup dalam saluran pencernaan baik manusia maupun hewan yang sehat. Nama bakteri ini diambil dari nama seorang bakteriologist yang berasal dari Germani yaitu Theodor Von Escherich, yang berhasil melakukan isolasi bakteri ini pertamakali pada tahun 1885. Dr. Escherich juga berhasil membuktikan bahwa diare dan gastroenteritis yang terjadi pada infant adalah disebabkan oleh bakteri *E. coli*.

Klasifikasi bakteri *Escherichia coli*, yaitu :

Superdomain	: Phylogenetica
Filum	: Proterobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: Escherichia
Species	: <i>Escherichia Coli</i>

4. ESBL (*Extended-spectrum β -Lactamase*)

β -Lactamase adalah adalah beberapa enzim yang memiliki kemampuan dalam menghidrolisis empat cincin atom C atau disebut β -Laktam pada antibiotika β -Lactam (penisilin, sefalosporin, monobaktam dan carbapenem. β -Lactamase pertama kali ditemukan pada tahun

1940 oleh Abraham dan Chain. Enzim ini berhasil ditemukan dari isolat *S. aureus* dan disebut sebagai penicillinase (Parasakthi 2001). ESBL atau *Extended-spectrum β -Lactamase* memiliki kemampuan untuk menghidrolisis antibiotik golongan penisillin, sefalosporin generasi satu, dua, dan tiga, serta golongan aztreonam kecuali sefamisin dan karbapenem dan dapat dihambat oleh β -lactamase inhibitor seperti clavulanat dan tazobactam. Enzim ini paling banyak dihasilkan oleh Enterobacteriaceae (terutama *E. coli*) dan *Klebsiella pneumoniae*. Mikroorganisme lain yang juga dilaporkan dapat menghasilkan enzim ESBL ialah *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Morganella morgagni*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Namun frekuensi produksi ESBL dari organisme tersebut tergolong masih rendah. ESBL berasal dari β -laktamase yang bermutasi. Mutasi ini menyebabkan peningkatan aktivitas enzimatik β -laktamase sehingga enzim ini dapat menghidrolisis sefalosporin generasi ke-3 dan aztreonam (de Been et al. 2014).

Gen yang bertanggung jawab terhadap produksi enzim ESBL berpusat pada plasmid dan berkembang menjadi titik mutasi, sehingga terjadi perubahan konfigurasi bagian aktif dari gen yang asli dan dikenal sebagai β -lactamase. Umumnya ESBL berasal dari gen TEM-1, TEM-2 dan SHV-1 yang mengalami mutasi dan mengubah susunan asam amino disekitar β -laktamase. Dengan adanya hal tersebut, spektrum antibiotik β -laktam menjadi lebih rentan oleh reaksi hidrolisis enzim ini.

Beberapa jenis ESBL yang sering ditemukan adalah SHV β -laktamases (kelas A), TEM β -laktamases (kelas A), CTX-M β -laktamases (kelas A), OXA lactamase (Kelas D) (de Been et al. 2014).

5. Amoxicillin

Amoksisilin merupakan antibiotika golongan penisilin (antibiotika β -laktam). Amoksisilin terbukti efektif melawan berbagai infeksi yang disebabkan oleh berbagai macam bakteri Gram-positif dan Gram negatif baik pada manusia maupun hewan. Amoksisilin mirip dengan ampisilin (semi-sintetis aminopenicillin) dalam aksi bakterisida dalam menghambat mikroorganisme. Amoksisilin bekerja melalui penghambatan biosintesis dinding sel mukopeptida (Kaur, Rao, and Nanda 2011).

Amoksisilin berwarna putih atau hampir putih (amoksisilin trihydrate) putih kristal, dan amoksisilin-natrium putih atau sedikit merah muda, amorf, bubuk sangat higroskopik, dengan sedikit bau *sulphurous*, kompatibel dengan sitrat, fosfat dan borat buffer 7-9. Amoksisilin natrium sangat larut dalam air, sedikit larut dalam etanol anhidrat, sangat sedikit larut dalam aseton, sementara Amoksisilin trihydrate sedikit larut dalam air, sangat sedikit larut dalam etanol (96%), praktis tidak larut dalam minyak lemak. Larut dalam asam encer dan encerkan larutan alkali hidroksida (Kaur, Rao, and Nanda 2011).

Amoksisilin bersifat bakterisida terhadap mikroorganisme resisten melalui penghambatan biosintesis dinding sel mukopeptida

selama pembelahan bakteri. Bekerja dengan mengikat *Penicillin Binding Protein 1A* (PBP-1A) yang terletak di dalam sel bakteri. Penisilin *acylate* domain transpeptidase sensitive penisilin terminal membuka cincin laktam yang menyebabkan inaktivasi enzim, menghambat *cross-linking* antara rantai polimer peptidoglikan linear yang membentuk komponen utama dari sel dinding bakteri, menghambat tahap ketiga dan terakhir dari sintesis dinding sel bakteri yang diperlukan untuk pembelahan sel dan bentuk sel serta proses penting lainnya (Kaur, Rao, and Nanda 2011).

Sel lisis ketika dimediasi oleh enzim autolitik dinding sel bakteri seperti autolysin; ada kemungkinan bahwa amoksisilin mengganggu inhibitor autolysin. Sintesis dinding sel yang tidak sempurna mengakibatkan sel bakteri untuk menyerap air melalui osmosis; sebagai bakteri gram positif & gram negatif memiliki 10-30 & 3-5 kali tekanan osmotik intraseluler dibandingkan ekstraseluler. Amoksisilin lebih efektif terhadap gram positif dari pada gram negatif dan hal itu menunjukkan kemampuan yang lebih besar pada penisilin. Obat golongan penisilin, menghambat pertumbuhan bakteri dengan mengganggu reaksi transpeptidasi sintesis dinding sel bakteri. Dinding sel adalah lapisan luar yang rigid yang unik pada setiap spesies bakteri. Dengan terhambatnya reaksi ini maka akan menghentikan sintesis peptidoglikan dan membunuh bakteri (Kaur, Rao, and Nanda 2011).

D. SINERGITAS

Sinergisme didefinisikan sebagai interaksi positif yang terjadi ketika dua agen digabungkan dan bersama-sama memiliki efek penghambatan (pada organisme yang ditargetkan) yang lebih besar daripada efek masing-masing (individual). Antagonisme didefinisikan sebagai efek dari dua obat bersama kurang dari efek individu atau tidak berpengaruh. Dalam terapi obat kombinasional, kombinasi dua atau lebih obat sering digunakan untuk mencapai tujuan terapeutik yang diinginkan atau untuk mengobati penyakit yang ada (Blesson et al. 2015).

Sinergisme merupakan konsep baru dalam mengembangkan agen untuk antibakteri, antioksidan dan juga untuk aktivitas antikanker. Mengobati infeksi bakteri dengan antibiotika memang banyak digunakan tetapi penggunaan yang tidak rasional telah menyebabkan terjadinya resistensi serta menyebabkan muncul kembali penyakit infeksi yang lama. Pendekatan baru adalah terapi kombinasi atau terapi sinergis; terhadap mikroorganisme yang resisten yang merupakan cara baru untuk mengobati penyakit infeksi (Blesson et al. 2015).

Adapun metode pengujian yang efektif digunakan pada pengujian sinergitas adalah mikrodilusi karena lebih sedikit menggunakan medium dan lebih kuantitatif. Pengujian tersebut dalam beberapa jurnal penelitian internasional menyebutkan metode tersebut adalah metode *checkboard dilution*. Dalam pengujian kombinasinya menggunakan *microplate* dengan 96 wells dengan penggunaan suspensi bakteri pada umumnya 1×10^6

CFU/mL (Septama and Panichayupakaranant 2016).

Teknik *Checkerboard* telah sering dan paling banyak digunakan untuk melihat dan menentukan interaksi -interaksi pada agen antimikroba. Istilah *checkerboard* muncul dari pengenceran berkelipatan pada kedua antimikroba yang diujikan. Hasil nilai KHM yang diperoleh dapat dihitung secara matematis dan dinyatakan dalam Indeks Konsentrasi Hambat Fraksional (FICI).

$$FICI = FIC (A) + FIC (1)$$

Keterangan :

FICI : *Fractional Inhibition Concentration Index*

$$FIC(A) = \frac{\text{KHM (A) Kombinasi}}{\text{KHM (A) Tunggal}} (2)$$

$$FIC(B) = \frac{\text{KHM (B) Kombinasi}}{\text{KHM (B) Tunggal}} (3)$$

Kemudian hasil dari perhitungan nilai FIC kombinasi kedua ekstrak dapat menunjukkan efek yang dihasilkan pada kombinasi kedua ekstrak tersebut. Adapun hasilnya dapat diinterpretasikan sebagai berikut :

Sinergis : FICI \leq 0,05

Antagonis : FICI $>$ 4

Efek aditif : FICI $>$ 0,5 tapi \leq 1

Efek berbeda : FICI $>$ 1 tapi \leq 4

(Balouiri, Sadiki, and Ibnsouda 2016)

E. STANDARDISASI

Standardisasi merupakan suatu rangkaian proses yang di dalamnya

melibatkan metode analisis fisik, kimia dan mikrobiologi berdasarkan data farmakologis dan toksikologi (kriteria umum keamanan) terhadap suatu bahan alam atau tumbuhan obat. Standardisasi secara umum bertujuan untuk memberikan efikasi yang terukur secara farmakologis dan menjamin keamanan konsumen. Standardisasi obat herbal meliputi 2 aspek penting, yaitu aspek parameter spesifik dan parameter non spesifik (Saifuddin, 2011).

1. Parameter spesifik

Aspek parameter spesifik difokuskan pada senyawa aktif yang bertanggung jawab dalam memberikan efek farmakologis. Parameter spesifik ditinjau secara universal artinya tidak dapat dipisahkan satu dengan yang lain. Analisis parameter spesifik ditujukan untuk mengidentifikasi secara kualitatif maupun secara kuantitatif suatu senyawa aktif yang berperan dalam suatu bahan alam. Parameter spesifik meliputi (Saifuddin, 2011):

a. Organoleptis

Pengamatan organoleptis meliputi parameter yang dapat dideskripsikan dengan sederhana menggunakan panca indera meliputi warna, bau, rasa dan bentuk yang seobjektif mungkin.

b. Identitas simplisia

Identitas simplisia meliputi deskripsi tata nama tumbuhan, nama lain tumbuhan, bagian tumbuhan yang digunakan (daun, akar, biji, dan lainlain) dan nama Indonesia tumbuhan.

c. Senyawa terlarut dalam pelarut tertentu

Melarutkan simplisia dengan pelarut tertentu yaitu air dan alkohol untuk mengetahui jumlah senyawa kandungan yang terlarut secara gravimetrik. Untuk mengetahui atau memberikan gambaran awal sifat senyawa kandungan bahan alam.

d. Uji kandungan kimia simplisia

Uji kandungan kimia ekstrak meliputi pola kromatogram dan kandungan kimia tertentu. Pola kromatogram bertujuan untuk memberikan gambaran awal profil kromatografi suatu senyawa (komposisi kandungan kimia) dengan dibandingkan dengan senyawa baku atau standar. Sedangkan kadar kandungan kimia tertentu dapat berupa senyawa aktif yang bertanggung jawab dalam memberikan efek farmakologis, senyawa identitas yaitu senyawa yang khas, unik, eksklusif, yang terdapat pada tumbuhan obat tertentu, senyawa major yaitu senyawa yang paling banyak secara kuantitatif dalam tumbuhan dan senyawa aktual yaitu senyawa apapun yang terdapat dalam bahan yang dianalisis.

2. Parameter nonspesifik

Aspek parameter non spesifik difokuskan pada aspek kimiawi, fisik, dan mikrobiologi yaitu yang berperan dalam keamanan konsumen secara langsung. Parameter non spesifik bertanggung jawab atas kualitas dan keamanan suatu bahan alam. Adapun parameter non spesifik diantaranya yaitu :

a. Susut pengeringan

Susut pengeringan berhubungan dengan kandungan air dalam suatu bahan alam atau simplisia, yang ditetapkan dengan pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada suhu 105°C menggunakan botol timbang yang berisi simplisia yang akan ditetapkan kadar susut pengeringannya. Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk memberikan gambaran rentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan.

b. Bobot jenis

Bobot jenis terkait dengan kontaminasi atau kemurnian ekstrak. Tujuan dari penentuan bobot jenis adalah untuk memberikan gambaran besarnya massa per satuan volume sebagai parameter khusus ekstrak cair sampai ekstrak pekat yang masih dapat dituang. Bobot jenis juga terkait dengan kemurnian dari ekstrak dan kontaminasi.

c. Kadar abu

Penetapan kadar abu bertujuan untuk memberikan gambaran terkait karakteristik sisa kadar abu Non organik setelah pengabuan. Kadar abu juga dapat dijadikan sebagai pencirian suatu spesies obat karena setiap tanaman memiliki sisa abu secara spesifik.

d. Kadar air

Parameter penetapan kadar air bertujuan untuk mengetahui kadar residu air setelah pengeringan atau proses pengentalan

ekstrak. Kadar air menentukan kualitas dan stabilitas ekstrak dalam bentuk sediaan selanjutnya. Kadar air yang cukup beresiko adalah di atas 10 %.

e. Sisa pelarut organik

Tujuan dari penetapan sisa pelarut organik adalah untuk mengetahui sisa pelarut etanol setelah pengeringan. Etanol dijadikan sebagai pelarut karena memiliki toksisitas yang lebih rendah dibanding dengan pelarut lain seperti methanol, kloroform, heksan, dll. Bahan alam yang aman dan berkualitas harus dipastikan di dalamnya tidak terdapat sisa pelarut organik.

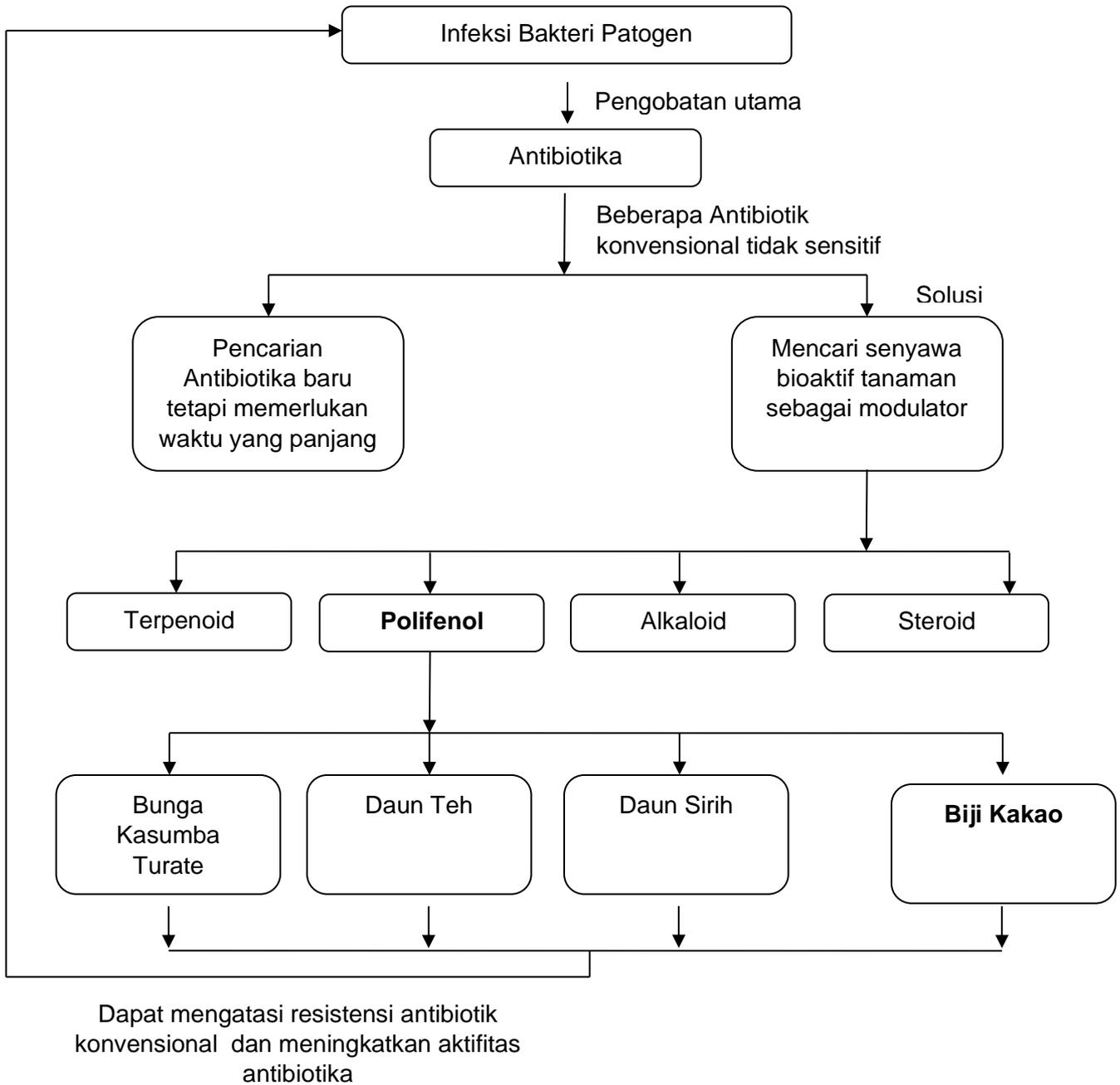
f. Cemaran mikroba

Aspek cemaran mikroba bertujuan untuk menentukan keberadaan mikroba yang sifatnya dapat merusak ekstrak sehingga dapat dilakukan upaya untuk mencegah kontaminasi atau menghilangkan kontaminasinya sesuai dengan persyaratan cemaran mikroba yang diperbolehkan.

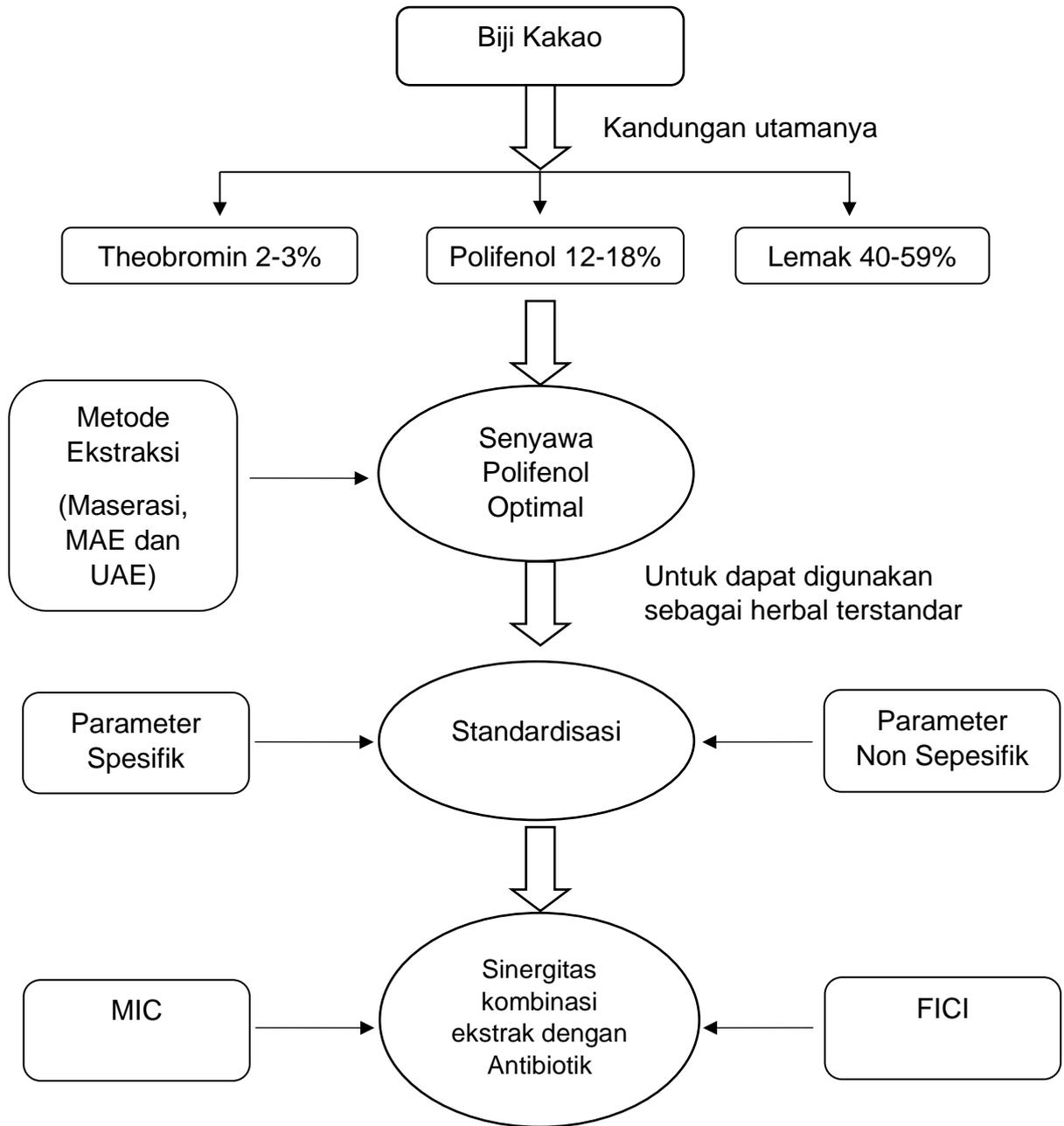
g. Cemaran Logam Berat

Parameter penetapan logam berat erat kaitannya dengan kualitas dan keamanan dari suatu bahan obat alam atau simplisia. Pemeriksaan cemaran logam dapat menjamin suatu bahan dan ekstrak tidak mengandung logam berat tertentu seperti Cd, Hg, Pb, dan logam berat lainnya.

F. KERANGKA TEORI



G. KERANGKA KONSEP



Keterangan :

○ Variabel Terikat

□ Variabel Bebas